ESTRUCTURA GENÉTICA Y DIVERSIDAD DE LINAJES DE *Pyricularia grisea* EN LA ZONA ARROCERA VENEZOLANA

Asia Y. Zambrano, Ariadne Vegas, Reinaldo Cardona, Zulay Gutiérrez y Jhonny R. Demey

RESUMEN

Se caracterizó la estructura genética y la diversidad de linajes de Pyricularia grisea*, en la zona arrocera venezolana. Se emplearon 448 aislamientos monospóricos de* P. grisea *provenientes de variedades comerciales, líneas experimentales, variedades foráneas y líneas diferenciadoras internacionales durante las cosechas de los años 1998, 1999 y 2000, en los estados de Barinas, Cojedes, Guárico y Portuguesa. La caracterización se realizó a través de la reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores* Pot2-1 *y* Pot2-2*. Fueron identificados siete linajes, identificados como Ven-1, Ven-2, Ven-3, Ven-4, Ven-5, Ven-6 y Ven-7. El estudio de las relaciones genéticas entre los linajes de* P. grisea generó *tres grupos homogéneos, el primero formado por el linaje Ven-5, el segundo por los linajes Ven-2, Ven-3, Ven-4 y Ven-7, y el tercero por los linajes Ven-1 y Ven-6. La distribución de frecuencias fue de 76,34; 11,16; 5,58; 2,01; 2,23; 1,56; y 1,12% para el Ven-1 al Ven-7, respectivamente. El índice de equidad ajustado por remuestreo identifica al estado Guárico como el "*hot spot site*".*

SUMMARY

The genetic structure and lineage diversity of Pyricularia grisea *in the Venezuelan rice zone were characterized using 448 monosporic isolates of* P. grisea *from commercial varieties, experimental lines, foreign varieties and international differential lines grown in plots during 1998, 1999 and 2000, in the Barinas, Cojedes, Guarico and Portuguesa states. Characterization was made by polymerase chain reaction amplification using primers* Pot2-1 *and* Pot2-2*. Seven lineages were identified as Ven-1, Ven-2, Ven-3, Ven-4, Ven-5, Ven-6 and Ven-7. The study of the genetic relations between the lineages of* P. grisea *generated three homogenous groups, the first formed by Ven-5, the second formed by the lineages Ven-2, Ven-3, Ven-4 and Ven-7, and the third by the lineages Ven-1 and Ven-6. Frequency counts were of 76.34, 11.16, 5.58, 2.01, 2.23, 1.56 and 1.12% for Ven-1 to Ven-7, respectively. The equitability index fit by resampling techniques identifies the State of Guarico as the* "hot spot site".

Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los mayores cereales producidos a nivel mundial, supliendo aproximadamente el 23% de la energía *per cápita* de seis mil millones de personas (Tan *et al.*, 2001). Ocupa el segundo lugar después del trigo en superficie cosechada, pero desde el punto de vista alimenticio una mayor cantidad de población depende del arroz. En Venezuela anualmente se cultivan alrededor de 135000ha de arroz con un producción anual promedio de 700000ton (IRRI, 2005), distribuidas en los estados Barinas, Cojedes, Delta Amacuro, Guárico y Portuguesa. Cerca del 85% de la producción nacional se concentra en el área bajo riego de los estados Guárico y Portuguesa, con un rendimiento promedio de 5,19t/ha (IRRI, 2005).

El hongo piricularia (*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.) es considerada la más devastadora enfermedad del arroz a nivel mundial, debido a su amplia distribución y las graves perdidas económicas que ocasiona. Produce una enfermedad criptogámica compleja debido a la variabilidad patogénica y la rapidez con que este hongo vence la resistencia de la planta. El micelio del hongo produce una sustancia tóxica conocida como piricularina, que inhibe el crecimiento de los tejidos y los desorganiza. En las hojas, las lesiones típicas son manchas elípticas de color gris o blanquecino en el centro y bordes marrones a rojizo, las cuales pueden unirse dependiendo de las condiciones ambientales y de la susceptibilidad del cultivar, lo que produce la reducción del área fotosintética y por tanto del rendimiento. En el cuello de la panícula, la colonización del hongo inhibe el flujo de fotosintetizados hacia los granos en formación, originando panículas vacías y la caída de las mismas. Los cultivares susceptibles sembrados en condiciones favorables para el desarrollo del hongo pueden ser totalmente destruidos en la fase de plántula o macolla-

PALABRAS CLAVE / Añublo / Diversidad genética / Linaje / *Oryza sativa* / *Pyricularia oryzae* / Sitio caliente /

Recibido: 25/01/2005. Modificado: 15/11/2005. Aceptado: 16/11/2005.

Asia Y. Zambrano. Doctora en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Venezuela (UCV). Investigador, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), Venezuela. Dirección: Apartado 4521. Maracay, 2101. Venezuela. e-mail: azambrano@inia.gob.ve

Ariadne Vegas. Doctora en Ciencias Agrícolas, UCV, Venezuela. Investigador, INIA-CENIAP, Maracay, Venezuela.

Reinaldo Cardona. Master en Fitopatología, Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, Venezuela. Investigador, INIA-Portuguesa, Venezuela.

Zulay Gutiérrez. Técnico Superior, Instituto Tecnológico Alonso Gamero, Venezuela. Técnico Asociado a la Investigación, INIA-CENIAP, Maracay, Venezuela.

Jhonny R. Demey. Master en Estadística, UCV, Venezuela. Bioestadístico, Centro de Biotecnología, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Venezuela. e-mail: jdemey@reacciun.ve

RESUMO

Caracterizou-se a estrutura genética e a diversidade de linhagens de Pyricularia grisea*, na zona arrozeira venezuelana. Se empregaram 448 isolamentos monospóricos de* P. grisea *provenientes de variedades comerciais, linhas experimentais, variedades forâneas e linhas diferenciadoras internacionais durante as colheitas dos anos 1998, 1999 e 2000, nos estados de Barinas, Cojedes, Guárico e Portuguesa. A caracterização se realizou a través da reação em cadeia da polimerasa com os iniciadores* Pot2-1 *e* Pot2-2. *Foram identificados sete linhagens, identificados como Ven-1, Ven-2, Ven-3, Ven-4, Ven-5, Ven-6 e Ven-7. O estudo das relações genéticas entre as linhagens de* P. grisea gerou *três grupos homogêneos, o primeiro formado pela linhagem Ven-5, o segundo pelas linhagens Ven-2, Ven-3, Ven-4 e Ven-7, e o terceiro pelos linhagens Ven-1 e Ven-6. A distribuição de freqüências foi de 76,34; 11,16; 5,58; 2,01; 2,23; 1,56; e 1,12% para o Ven-1 ao Ven-7, respectivamente. O índice de eqüidade ajustado por re-amostragem identifica ao estado Guárico como o "*hot spot site*".*

miento. Cuando no hay destrucción total del cultivo es bastante difícil estimar las perdidas, por lo que no hay una estimación exacta de las mismas, pero se considera que las perdidas son proporcionales al porcentaje del área foliar o del cuello de la panícula afectada (Ou, 1985).

El mecanismo de resistencia genética a piricularia ha sido atribuido a genes dominantes de efectos mayores (Kiyosawa *et al*., 1986) y en otros casos a grupos de genes de efectos menores (Lin, 1986 y Wang *et al*., 1989), constituyendo el desarrollo de variedades resistentes a la enfermedad la vía más económica para su control y con menor impacto ambiental. Sin embargo, esta resistencia es usualmente superada después de que los cultivares son liberados, debido a los continuos cambios y evolución del patógeno, los cuales dan origen a nuevos patotipos en el ecosistema compatibles con los cultivares resistentes. La liberación de variedades resistentes requiere la implementación de prácticas agrícolas integrales que tomen en cuenta la interacción entre los genes de resistencia y las poblaciones del patógeno, la dinámica de virulencia del hongo y el flujo de genes a las malezas y a especies silvestres relacionadas al arroz (Roca *et al.*, 1996)

Los aspectos de mayor importancia a ser considerados en el desarrollo de variedades con resistencia duradera a la enfermedad causada por el hongo piricularia son la identificación del sitio (*hot spot site*) donde se realizará la selección de progenitores y líneas, y la identificación fiable de las razas del hongo. En el primer aspecto, Correa-Victoria y Zeigler (1994) indican que un sitio será considerado más caliente o *hot spot site* si existe una alta presión de la enfermedad y diversidad del patógeno asociada a condiciones ambientales favorables al desarrollo del hongo. En el segundo, la gran variabilidad patogénica del hongo es una de las mayores limitantes en el mejoramiento genético (Ahn, 1994), por lo que la utilización del concepto de linaje o familias genéticas con características similares e identificadas a través de *'fingerprinting'* del ADN del hongo y de su espectro de virulencia en pruebas de invernadero, reduce la complejidad del manejo del gran número de razas del hongo (Guimaraes *et al*., 1996, 1998; George *et al*., 1998), permitiendo establecer programas de mejoramiento basados en la teoría de exclusión de linajes (Levy *et al*., 1991).

Para el estudio de la estructura genética e identificación de linajes de *P. grisea* se han utilizado dos metodologías. Levy *et al.* (1991) agrupan la población del hongo en familias genéticas a través de la utilización de la secuencia repetitiva de ADN conocida como MGR586 o *'fingerprinting'* del ADN. Esta sonda que utiliza la técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) restringiendo el ADN del hongo con la enzima *EcoRI*, detecta entre 50 y 60 perfiles geonómicos. George *et al.* (1998) desarrollaron la técnica rep-PCR (*Repetitive Element-Based Polymerase Chain Reaction*) usando los iniciadores Pot-2, la cual posee la misma sensibilidad para discriminar los aislamientos de *P. grisea* que la técnica RFLP, pero es más simple y económica, demostrándose la correspondencia entre los linajes definidos por rep-PCR y por RFLP.

Se han realizado numerosos estudios moleculares de diversidad genética de *P. grisea* con aislamientos del hongo provenientes de diferentes regiones del mundo, detectándose que están compuestos de pequeños números, entre 2 y 8, de linajes bien diferenciados. Se han detectado 6 linajes en Colombia (Levy *et al.*, 1991, 1993), 7 linajes en Filipinas (Zeigler *et al.*, 1995), 5 linajes en Europa (Francia, Hungría, Italia, Portugal y España; Roumen *et al.*, 1997), 8 linajes en Estados Unidos (Correl *et al.*, 2000), 2 linajes en Brasil (Prabhu *et al.*, 2002) y 5 linajes en Irán (Javan-Nikkhah *et al.*, 2004). La conformación de la referencia internacional de la diversidad del patógeno permitirá la selección de fuentes de resistencia para regiones productoras de arroz del mundo.

En Venezuela se han realizado estudios preliminares de estandarización de la metodología de amplificación de rep-PCR (Arnao *et al.*, 2003). Con el objeto de generar la información básica que contribuya a la estrategia de mejoramiento, en el presente trabajo se caracteriza la estructura genética y se estudia la diversidad de linajes de *P. grisea* en la zona arrocera venezolana, a través de la técnica rep-PCR.

Materiales y Métodos

Material vegetal

La colección del hongo se realizó en parcelas comerciales de los estados venezolanos de Barinas, Cojedes, Guárico y Portuguesa, en las localidades de Toruno, San Carlos, Bancos de San Pedro y Araure. El muestreo fue realizado de manera aleatoria sobre las variedades comerciales, líneas experimentales, variedades foráneas y líneas diferenciadoras internacionales sembradas durante las cosechas de los años 1998, 1999 y 2000, y se afijo proporcionalmente sobre el área sembrada por localidad, a razón de 25, 19, 47 y 9% para los estados Barinas, Cojedes, Guárico y Portuguesa, respectivamente, que representan el 98% del área total sembrada de arroz en Venezuela.

Las fuentes de aislamiento del hongo se obtuvieron de 27 cultivares, de los cuales ARAURE 1, ARAURE 2, ARAURE 3, ARAURE 4, CIMARRON, FONAIAP 1, FONAIAP 2, CT 15 y PALMAR son variedades comerciales que han sido sembradas en Venezuela durante los últimos 20 años; CMCEPA, FD9702, FD9706, LINEA 6 y PN97A004 son líneas experimentales; BLUEBONNET 50, CAPI 93, FANNY, IR8, IRGA416, MUDGO, ORYZICA LLANO 5, ORYZICA 1, UF1 y UF4 son variedades foráneas; y CALORO, DULAR y SHA TIA TSAO líneas diferenciadoras internacionales.

Aislamiento y multiplicación del hongo

La recolección de las hojas infectadas en el campo, el aislamiento y la multiplicación del hongo en el laboratorio fueron realizadas según metodología descrita por Guimaraes *et al*. (1996). Los aislamientos fueron obtenidos en campo de hojas enfermas de los diferentes cultivares sembrados a partir de secciones de hojas con una sola lesión, lavada previa colocación en cámara húmeda. Los aislamientos fueron incubados por 24 a 48h en ambiente de laboratorio con el objeto de inducir la esporulación. Una vez esporuladas las lesiones, con la ayuda de un microscopio estereoscopio y un hisopo metálico, se tomaron esporas que fueron transferidas y esparcidas en cajas de Petri estéril contentivas de agar-agua acidificado (AAA). A las 24h de ser transferidas, se tomaron secciones de AAA contentivas de una sola espora germinada, ubicada con la ayuda del microscopio y se colocaron 5 trozos por caja de Petri estéril contentiva de agar-salvado de arroz (ASA) obteniendo así los aislamientos monospóricos. La identificación de *P. grisea* fue confirmada con la ayuda de un microscopio compuesto.

Cada aislamiento se almacenó sobre papel de filtro seco bajo refrigeración (-4ºC) hasta su utilización. Los aislamientos fueron reactivados colocando una sección de papel de filtro contentivo de micelio y esporas del hongo en una cápsula de Petri estéril conteniendo ASA. Se obtuvo un total de 448 aislamientos monospóricos de *P. grisea* provenientes de hojas de arroz infectadas en campo.

Extracción y amplificación del ADN

El ADN total de cada aislamiento monospórico de *P. grisea* se extrajo mediante el protocolo de miniextracción con CTAB descrito en CIAT (1994), la cuantificación se realizó por comparación visual con el ADN de fago λ no digerido y su amplificación se efectuó según metodología propuesta por George *et al.* (1998) y CIAT (1994).

Las amplificaciones del ADN se realizaron en una mezcla de reacción final de 25µl constituida por 2,5mM de tampón 10X (10mM tris HCl; pH 9,0; 50mM KCl; 0,1% Triton® X-100); 1,5mM de $MgCl_2$; 750µM de sulfato de amonio; 0,185mM de dNTPs (A, C, G y T); 2,5U de Taq polimerasa (Promega®); 100ng de ADN; y 0,5µM de cada uno de los iniciadores *Pot2-1* [5'-CGG AAG CCC TAA AGC TGT TT-3'] y *Pot2-2* [5'-CCC TCA TTC GTC ACA CGT TC-3']. Se adicionó 20µl de aceite mineral para cubrir la reacción.

La amplificación fue realizada en un termociclador modelo GeneE (TECHNE®), bajo los siguientes perfiles de temperatura: 1 ciclo de desnaturalización a 95ºC por 2,5min; 4 ciclos cada uno con un segmento de desnaturalización a 94ºC por 1min; uno de alineamiento de iniciadores a 62ºC por 1min; y uno de extensión a 65ºC por 10min. Ello fue seguido por 26 ciclos cada uno con 30s a 95ºC de desnaturalización, 1min a 62ºC de alineamiento de *primer* y 10min a 65ºC de extensión, con un ciclo de extensión final a 65ºC por 10min.

Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1,0% y buffer TBE 1X, corridos por 4h a 120V, visualizando los fragmentos de amplificación con bromuro de etídio y se fotografiaron con una película tipo Polaroid 667.

Análisis de los datos

Para el análisis molecular de los linajes, los fragmentos de amplificación obtenidos fueron codificados como 0 y 1 para fragmentos ausentes y presentes, respectivamente. El contenido de información polimórfica (PIC) y el error estándar Bootstrap asociado a este, se utilizaron para evaluar la capacidad del iniciador en detectar el polimorfismo del locus en los linajes de *P. grisea* caracterizados (Anderson *et al.,* 1993). Se calculó la probabilidad de obtener parejas idénticas de alelos por cambio de alelo en los linajes según metodología descrita por Wetton *et al.* (1987) y Ramakrishna *et al.* (1994), modificada por Demey *et al*. (2003).

Con los patrones generados se estudiaron las relaciones genéticas entre los linajes de *P. grisea* a través de la representación gráfica generada por el método no-jerarquico del *Neighbor Joining* (Saitou y Nei, 1987) y la disimilitud debida al coeficiente de Dice (Dice, 1945). La estabilidad de la agrupación se estudió a través del árbol de consenso generado por remuestreo (n=1000; Felsenstein, 1985; Nei y Kumar, 2000).

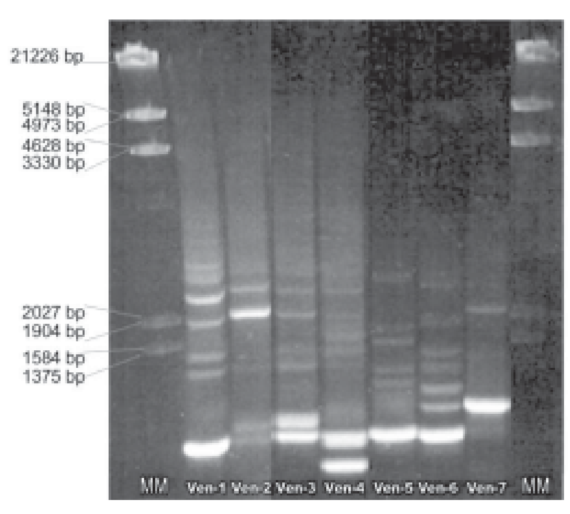
La equidad, calculada como Índice de diversidad de Shannon / Ln (número de especies) (Pielou, 1975) ajustada por remuestreo para n=1000 según metodología descrita por Pla (2004), es utilizada para estimar la diversidad de los linajes de *P. grisea* por localidad, años y para el total en estudio. El índice de equidad derivado de los vectores de frecuencias por linaje, remuestreados con reemplazo, proporciona una medida relativa de la homogeneidad en que se distribuyen los 448 aislamientos monospóricos de *P. grisea* dentro de los diferentes linajes y permite confrontar las localidades y determinar el sitio más caliente o *hot spot site*, bajo el supuesto que el menor valor del índice de equidad esta asociado a una menor diversidad o mayor concentración en alguno de los linajes presentes.

Todos los análisis se realizaron utilizando Info-Gen ver. 1 (Balzarini *et al.*, 2003), InfoStat ver. Profesional (InfoStat, 2004), Resampling Stats ver. 5,02 (Resampling, 1999), FreeTree ver. 0.9.1.50 (Pavlicek *et al.*, 1999) y Treeview ver. 1.6.0. (Page, 1996).

Resultados y Discusión

El método de extracción de ADN fue simple, rápido y eficiente, produciendo entre 200 y 300ng/µl de ADN de buena calidad. Los iniciadores *Pot2-1 y Pot2-2* detectaron siete linajes, identificados como Ven-1, Ven-2, Ven-3, Ven-4, Ven-5, Ven-6 y Ven-7. El patrón electroforético y la identidad genética en pares de bases de los linajes venezolanos de *P. grisea* se muestran en la Figura 1. El contenido de información polimórfica (PIC) promedio fue de 0,2518 ±0,1191 con un valor mínimo de 0,2149 y un máximo de 0,3698; este valor máximo de PIC correspondió a los loci *Pot2*-125, *Pot2*-2008, *Pot2*-2019, *Pot2*-2322 y *Pot2*-2428, lo que representa más del 50% del contenido de información polimórfica del intervalo teórico de 0,01 a 0,50, por lo que estos fragmentos de amplificación pueden ser usados como referencia en subsecuentes investigaciones. El índice de similaridad promedio fue de 0,2006 ±0,0323. La probabilidad de que dos diferentes linajes venezolanos de *P. grisea*, usando los iniciadores *Pot-2,* tengan igual identidad es de $2,51x10^{-16}$, lo que indica un alto grado de confianza en la identificación hasta de 10^{16} linajes comparados simultáneamente, permitiendo detectar el linaje específico de cada uno de los 448 aislamientos monospóricos de *P. grisea* provenientes de las muestras de hojas de las variedades comerciales, líneas experimentales, variedades foráneas y líneas diferenciadoras internacionales, sembradas entre los años 1998 y 2000.

La Figura 2 muestra las relaciones genéticas entre los linajes de *P. grisea*. El árbol genera tres grupos homogéneos, el primero formado por el linaje Ven-5, el segundo lo forman los linajes Ven-2, Ven-3, Ven-4 y Ven-7, y el



Identidad Genética

Ven-1: [Pot2-118, Pot2-2008, Pot2-2019, Pot2-2310, Pot2-2405, Pot2-2484, Pot2-2525]

Ven-2: [Pot2-125, Pot2-138, Pot2-2322, Pot2-2436]

Ven-3: [Pot2-125, Pot2-140, Pot2-2008, Pot2-2019, Pot2-2322, Pot2-2428]

Ven-4: [Pot2-102, Pot2-125, Pot2-2019, Pot2-2035, Pot2-2428]

Ven-5: [Pot2-125, Pot2-1988, Pot2-2008, Pot2-2028, Pot2-2603]

Ven-6: [Pot2-120, Pot2-405, Pot2-1080, Pot2-2008, Pot2-2027, Pot2-2322]

Ven-7: [Pot2-456, Pot2-2428]

MM: Marcador Molecular (ADN de λ digerido con EcoRI + Hind III)

Figura 1. Patrón electroforético e identidad genética de linajes venezolanos del hongo *P. grisea* mediante PCR.

tercero los linajes Ven-1 y Ven-6. Así mismo, se destaca la diferencia del Ven-5 respecto al resto de los linajes. La distribución de frecuencia de los linajes fue 76,34; 11,16; 5,58; 2,01; 2,23; 1,56; 1,12% para el Ven-1 al Ven-7, respectivamente. Los resultados no permiten establecer una correspondencia entre las relaciones genéticas de los linajes estudiados a través del árbol de consenso y su distribución. Aunque se destaca que en el 100% de los casos en que se construye el árbol el linaje Ven-5 se diferencia del resto, la distribución de frecuencia no muestra diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) respecto a los linajes Ven-4, Ven-6 y Ven-7.

La Tabla I presenta las frecuencias de los linajes de *P. grisea* por localidad y año, y el índice de equidad asociado. Los resultados referidos al índice de equidad muestran que, con excepción del año 2000, el estado Guárico es el sitio más caliente. Este índice ajustado por la metodología del Bootstrap corrige las imperfecciones derivadas del muestreo, garantizando la calidad de los resultados obtenidos. Adicionalmente, la distribución de frecuencia observada del linaje Ven-1 es >75%, lo que disminuye la incertidumbre respecto a las frecuencias de ceros. Las localidades con índice equidad igual o cercana a 1 indican que la distribución de la probabilidad de aparición de cada linaje es constante e igual a 1/número de linajes.

Estos resultados fueron corroborados generando las diferencias necesarias para que todos los sitios tuviesen la misma frecuencia de linajes, es decir, el número de linajes que hubiesen sido necesarios para producir el mismo valor de diversidad de Shannon para cada localidad. Este análisis de “redundancia” mostró resultados similares a los obtenidos con el índice de equidad ajustado (datos no mostrados).

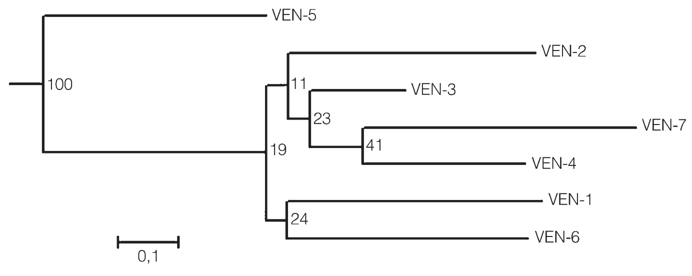


Figura 2. Relaciones genéticas entre los linajes de *P. grisea*, estudiada a través del árbol generado con la disimilitud debida al coeficiente de Dice y el *Neighbor-Joining* como método de agregación.

Estudios moleculares de diversidad genética de *P. grisea* con aislamientos del hongo provenientes de diferentes regiones del mundo señalan que en relación con Venezuela (7 linajes) existe menor diversidad del hongo en Brasil (Prabhu *et al*., 2002), Irán (Javan-Nikkhah *et al*., 2004), Francia, Hungría, Italia, Portugal y España (Roumen *et al*., 1997) y Colombia (Levy *et al*., 1991 y 1993); igual diversidad del patógeno en Filipinas (Zeigler *et al*., 1995) y mayor diversidad de *P. grisea* en Estados Unidos (Correl *et al*., 2000). Estos resultados indican que Venezuela posee una diversidad del patógeno que contribuye en forma significativa con la conformación de la referencia internacional que permitirá la selección de fuentes de resistencia para regiones productoras de arroz del mundo.

El conocimiento sobre la caracterización de las familias genéticas de *P. grisea* presentes en el país contribuirá de manera significativa al establecimiento de la estrategia de mejoramiento basada en la teoría de exclusión de linajes, tomando en cuenta que en cada región donde se cultiva arroz existen grupos de linajes diferentes y, por lo tanto, se deberán seleccionar progenitores que aporten genes de resistencia a dichos grupos.

La determinación del *hot spot site* o la localidad con mayor presión y diversidad de linajes adquiere importancia a la hora de emprender un programa de mejoramiento en la zona arrocera venezolana, ya que las localidades estudiadas presentan condiciones ambientales similares, caracterizadas por altas temperaturas, humedad relativa y diferencia entre temperaturas diurnas y

TABLA I
FRECUENCIAS DE LOS LINAJES Y EQUIDADES AJUSTADAS POR LOCALIDAD Y AÑO

Año	Localidad	Linajes 1	2	3	4	5	6	7	Índice de equidad ajustado
1998	Barinas	10	2	0	0	0	0	0	0,6244
	Cojedes	16	1	1	0	0	0	0	0,6191
	Guárico	50	2	3	1	0	0	0	0,4462
	Portuguesa	18	2	1	0	5	1	0	0,8830
1999	Barinas	71	19	2	0	2	3	1	0,5545
	Cojedes	47	10	4	3	1	1	2	0,6506
	Guárico	82	4	12	5	1	2	2	0,5199
	Portuguesa	0	2	0	0	1	0	0	1,0000
2000	Barinas	1	0	1	2	0	0	0	0,9809
	Cojedes	si	si	si	si	si	si	si	si
	Guárico	39	8	0	47	0	0	0	0,6811
	Portuguesa	8	0	1	9	0	0	0	0,2886
Total	Barinas	82	21	3	0	2	3	1	0,5336
	Cojedes	63	11	5	3	1	1	2	0,5662
	Guárico	171	14	15	6	1	2	2	0,4198
	Portuguesa	26	4	2	0	6	1	0	0,7732

si: Sin información

nocturnas (Muñoz y Gamboa, 1998; Navas *et al.*, 2003), condiciones que han sido reportadas como favorables a desarrollo del hongo.

El monitoreo de la evolución que conduce a cambios importantes en el espectro genético de la estructura y de la virulencia del patógeno es importante para identificar genes de resistencia y sus combinaciones, que les permitan resistir los nuevos patotipos y prevenir la interrupción de la resistencia.

Aunque no es posible predecir si la resistencia a una enfermedad es duradera o efímera, el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones del patógeno puede ser de utilidad para hacer predicciones sobre la posibilidad de adaptación del patógeno a las variedades resistentes, lo cual es de interés antes de que éstas se siembren extensivamente. El conocimiento de los linajes de *P. grisea* que afectan los cultivares de arroz bajo ensayos comerciales en Venezuela es de utilidad para el establecimiento de los programas de mejoramiento tradicionales, ya que la resistencia duradera es debida a la combinación multigénica de variedades que expresan la complementariedad de la resistencia a un amplio rango de linajes del hongo.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue parcialmente financiada por el INIA-CENIAP y FUNDARROZ a través del proyecto: "Identificación y caracterización de razas y linajes genéticos del hongo *Pyricularia grisea* en Venezuela".

REFERENCIAS

Ahn SW (1994) International collaboration on breeding for resistance to rice blast. En Zeigler RS, Leong SA, Teng PS (Eds.) *Rice blast disease*. CABI/IRRI. Wallingford, RU. pp 137-153.

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome 36*: 181-186.

Arnao E, Vegas A, Gutiérrez Z, Marín C(2003) Estandarización de la técnica de PCR para la caracterización genética de una población venezolana de *Pyricularia grisea*. *Fitopatol. Venez. 16(1)*: 3-10.

Balzarini M, Di Rienzo J, Casanoves F (2003) Info-Gen: Un ambiente integrado para el análisis de datos genéticos. En *II Meeting Caribbean and Central American Region*. International Biometrics Society. Puerto Rico, USA. pp. 20.

CIAT (1994) *Taller Integración de fitopatología; mejoramiento y biología molecular para el desarrollo de resistencia estable al añublo del arroz* (Pyricularia grisea). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Calí, Colombia.

Correa-Victora FJ, Zeigler RS (1994) Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "hot spot" breeding site in Eastern Colombia. *Plant Dis. 77*: 1029-1035.

Correl JC, Harp TL, Guerber JC, Zeigler RS, Liu B, Cartwright RD, Lee FN (2000) Characterization of *Piricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Ecol. Popul. Biol. 901*: 398-14-04.

Demey JR, Zambrano AY, Fuenmayor F, Segovia V (2003) Relación entre las características moleculares y morfológicas en una colección de Yuca. *Interciencia 28*: 684-689.

Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology 26*:297-302.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution 39*: 783-791.

Filippi MC, Prabhu AS, Levy EM (1999) Differential compatibility of *Pyricularia grisea* isolates with some Brazilian irrigated rice cultivars. *Fitopatol. Bras. 24*: 447-450.

George MLC, Nelson RJ, Zeigler RS, Leungh H (1998) Rapid population analysis of Magnaporthe grisea by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology 88*: 223-229.

Guimaraes EP, Ospina P, Correa-Victoria E (1996) Empleo del concepto de linajes de *Pyricularia grisea* para escoger germoplasma de arroz resistente. *Fitopatol. Venez. 9*: 2-6.

Guimaraes EP, Amézquita MC, Lema G, Correa-Victoria F (1998) Determination of minimum number of growing seasons for assessment of disease resistance stability in rice. *Crop. Sci. 38*: 67-71.

InfoStat (2004) InfoStat software Estadístico. Versión 1.1. Córdoba, Argentina.

IRRI (2005) *Recent trends in the rice economy. Rice production, area and yield*. www. irri.org/ science/ricestat/index. asp.

Javan-Nikkhah M, McDonald B, Banke S, Hedjaroude GA (2004) Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* populations based on rep-PCR fingerprinting. *Eur. J. Plant Pathol. 110*: 909-919.

Kiyosawa S, Mackill DJ, Bonman JM, Tanaka Y, Ling ZZ (1986) An attempt of classification of world's rice varieties based on reaction pattern to blast fungus strains. *Bull. Nat. Inst. Agrobiol. Resour.. 2*: 13-39.

Levy M, Romano J, Marchetti MA, Hamer JE (1991) DNA fingerprinting with dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *Plant Cell 3*: 95-102.

Levy M, Correa-Victoria F, Zeigler R, Xu S, Hamer J (1993) Genetic diversity of rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology 83*: 1427-1433.

Lin SC (1986) Genetic analysis of minor gene resistance to blast in japonica rice. En *Rice Genetics*. International Rice Research Institute. Manila, Filipinas. pp. 451-469.

Muñoz L, Gamboa P (1998) *Introducción al manejo integrado de enfermedades fungosas en arroz*. Manual Técnico Agroisleña. Aragua, Venezuela. 95 pp.

Navas M, Gamboa C, Torres O, Salazar M, Marín C, Crespo J, Gutiérrez R (2003) Estimación de la época de mayor presión de inóculo de *Pyricularia grisea* Sacc. en el campo experimental del Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Barinas, Venezuela. *Investigación Agrícola 8*(2) www.redpavfpolar.info.ve/danac/volumen8/ art2/index. html

Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York, EEUU. 333 pp.

Ou SH (1985) *Rice Diseases*. 2ª ed. Commonwealth Agricultural Bureau. Wallingford, Inglaterra. 660 pp.

Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences. 12:* 357-358.

Pavlicek A, Hrda S, Flegr J (1999) FreeTree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biol, (Praha) 45*: 97-99.

Pielou EC (1975) *Ecological Diversity*. Wiley. Nueva York, EEUU. 165 pp.

Pla L (2004) Bootstrap confidence intervals for the Shannon biodiversity index: A simulation study. *J Agric. Biol. Environ. Stat. 9*: 1-15.

Prabhu AS, Filippi MC, Araujo LG, Faria JC (2002) Genetic and phenotypic characterization of isolates of *Pyricularia grisea* from the rice cultivars epagri 108 and 109 in the state of Tocantins. *Fitopatol. Bras. 27*: 566-573.

Ramakrishna W, Lagu WD, Gupta VS, Ranjekar PK (1994) DNA fingerprinting in rice using oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. *Theor Appl Genet. 88*: 402-406.

Resampling (1999) *Resampling Stats* ver. 5,02. Resampling Stats Inc. Arlington, EEUU.

Roca W, Correa-Victora FJ, Martínez C, Tohme J, Lentini Z, Levy M (1996) Developing durable resistance to rice blast: Productivity and environmental considerations. Biotechnology Seminar Paper. *Isnar Biotechnology Service*. pp 74-78.

Roumen E, Levy M, Nottegehem JL (1997) Characterisation of the European pathogen population of *Magnosporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. *Eur. J. Plant Pathol. 103*: 361-371.

Saitou N, Nei N (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol. 4*: 406-425.

Tan YF, Sun M, Xing YZ, Hua JP, Sun XL (2001) Mapping quantitative trait loci for milling quality, protein content and color characteristics of rice using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. *Theor. Appl. Genet. 103*: 1037-1045.

Wang Z, Mackill DJ, Bonman JM (1989) Inheretance of partial resistance to blast in indica rice cultivars. *Crop Sci. 29*: 848-853.

Wetton JH, Carter RE, Parkin DT, Walters D (1987) Demographic study of a wild House Sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature 327*: 147-149.

Zeigler RS, Cuoc LX, Scott RP, Bernardo MA, Chen DH, Valent B, Nelson RJ (1995) The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. *Phytopathology 85*: 443-451.